

PCT/JP03/16580

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

24.12.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 6月30日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-187675
[ST. 10/C]: [JP2003-187675]

出 願 人
Applicant(s): 小森 博達
波呂 浩孝

REC'D 19 FEB 2004

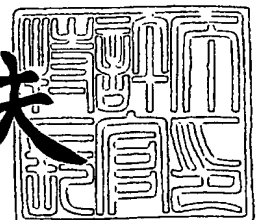
WIFO

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 2月 6日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP-1385

【提出日】 平成15年 6月30日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 38/48

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都目黒区南 2 - 1 0 - 8

 【氏名】 波呂 浩孝

【特許出願人】

 【住所又は居所】 東京都小金井市貫井北町 2 - 1 1 - 1 9

 【氏名又は名称】 小森 博達

【特許出願人】

 【住所又は居所】 東京都目黒区南 2 - 1 0 - 8

 【氏名又は名称】 波呂 浩孝

【代理人】

 【識別番号】 100091731

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 高木 千嘉

 【電話番号】 03-3261-2022

【選任した代理人】

 【識別番号】 100080355

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 西村 公佑

【選任した代理人】

 【識別番号】 100105290

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 三輪 昭次

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2002-373527

【出願日】 平成14年12月25日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015565

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 委任状 2

【援用の表示】 平成 1 5 年 6 月 2 6 日付け提出の包括委任状

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヘルニア治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 1 または複数のヒト由来の蛋白質分解酵素を有効成分として含有し、ヘルニア患部に直接投与されることを特徴とするヘルニア治療剤。

【請求項 2】 ヒト由来の蛋白質分解酵素が細胞外マトリックス分解酵素である請求項 1 のヘルニア治療剤。

【請求項 3】 MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-13、MT1-MMP およびアグリカネース (aggrecanase) からなる群から選択される 1 または複数の細胞外マトリックス分解酵素を有効成分として含有する請求項 2 に記載のヘルニア治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒト由来の蛋白質分解酵素を有効成分として含有するヘルニア治療剤に関する。このヘルニア治療剤は、椎間板ヘルニア患部への直接投与によって、ヘルニアの自然退縮を促進する。

【0002】

【従来の技術】

脊椎体と脊椎体の間に存在する円盤状の軟骨体である椎間板は、内側の髄核とこれを取り囲む外側の線維輪から構成され、プロテオグリカン、アグリカン、II 型コラーゲンなどの軟骨成分からなる。椎間板は、主に加齢と共に生じる椎間板中の水の含量の減少により弾力性が失われ、椎間板の軟骨成分の消失と線維組織の増生が認められ、いわゆる内層の髄核と外層の線維輪の 2 重構造が破綻する。これらの変化を椎間板変性と呼ぶ。この椎間板変性は加齢性変化であり、20 才から始まって、70 才までにはほぼ全ての椎間板組織で変性変化を認める。椎間板ヘルニアは変性髄核が脆弱した線維組織を破って脊柱管内に脱出して、神経根や馬尾を圧迫して疼痛や麻痺などを起こすものである。

【0003】

磁気共鳴画像法 (magnetic resonance imaging: MRI) は、椎間板ヘルニアを診断するために広く利用されている。レントゲンと異なり被爆もしないために、頻回の検査の施行が可能である。経時的に撮像を行うことにより、椎間板ヘルニアでは経時的に体積が減少する自然退縮機序が認められることがわかってきた。また、造影剤ガドリニウムジエチレントリアミンペンタ酢酸 (Gd-DTPA) を用いることで椎間板ヘルニア組織に造影効果が確認された場合には、ヘルニア内での血管増生が盛んであると判断でき、より自然退縮が起きることが期待できる。これにより、予後診断も可能となる。

【0004】

手術により摘出されたヘルニア塊を免疫組織学的に検討すると、ヘルニア塊の軟骨基質の中に新生血管の増生と多数のマクロファージを中心とした炎症性細胞の浸潤が認められる (例えば、非特許文献1参照)。また、浸潤してきたマクロファージや椎間板内の軟骨細胞がマトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix metalloproteinase: MMP) に属するMMP-3とMMP-7を強発現していることが確認された (例えば、非特許文献2および3参照)。MMPは中性領域で主に作用する酵素で、関節内や椎間板組織では生理的に発現している。MMP-3とMMP-7は軟骨組織の主成分であるプロテオグリカン、アグリカンを基質としている。このため、椎間板ヘルニア内ではMMP-3とMMP-7がヘルニア組織の分解及び退縮に重要な作用を有することが推測されている。

また、野生型マウスの椎間板を蛋白分解性のマクロファージと共培養した場合には、MMP-3欠損型マウスの椎間板とマクロファージとの共培養の場合に比べて椎間板重量の減少が大きかった。また、野生型マウスおよびMMP-3欠損マウスを用いた実験によって、MMP-3がマクロファージを椎間板内に走化させる作用のある (MMP-3がマクロファージに対する走化性因子として働く) ことも確認されている (例えば、非特許文献4参照)。

MMP-7は炎症性サイトカインであるTNF- α を誘導し、そのTNF- α が椎間板細胞におけるMMP-3の産生を促進することも報告されている (例えば、非特許文献5参照)。

【0005】

【非特許文献 1】

Haro et al., Spine 21(1996), 1647-1652

【非特許文献 2】

Haro et al., Spine 22(1997), 1098-1104

【非特許文献 3】

Haro et al, J. Spinal. Disorders 12(1999), 245-249

【非特許文献 4】

Haro et al., J. Clin. Invest. 105(2) (2000), 133-141

【非特許文献 5】

Haro et al., J. Clin. Invest. 105(2) (2000), 143-150

【0006】

椎間板ヘルニアの外科治療は、ヘルニア塊を外科的に摘出して神経の除圧をはかることが広く行われている。しかし、本疾患が青年層や中年層に多く、スポーツ選手にも比較的多く認められることから、手術治療ではなく非侵襲的な治療が求められている。すでに、米国やヨーロッパでは、植物から抽出したキモパパイニン等の酵素を椎間板ヘルニア中に注入する治療が行われているが、免疫反応や神経毒性などが報告されている。しかし、ヒトの椎間板ヘルニアで発現している MMP-3、MMP-7 等のヒト由来の蛋白質分解酵素を治療剤として使用する試みは全くなされていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、ヒトの椎間板ヘルニアの自然退縮に関与していると考えられるヒト由来の蛋白質分解酵素の臨床応用の有効性を確認し、椎間板ヘルニアの治療剤を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

上記の課題を解決するため、MMP-3、MMP-7 のようなヒト由来の蛋白質分解酵素を、椎間板ヘルニア内に直接投与する椎間板ヘルニア注入治療剤とすることである。

【0009】

これまでの研究によって椎間板ヘルニアの退縮に関与していると考えられる物質としては、上記したMMP-3およびMMP-7が挙げられている。また、MMP-8、MMP-13、MT1-MMP (MMP-14) およびアグリカネース (aggrecanase) も同様の作用を有すると考えられる。MMP-3 (E.C.3.4.24.17) は、stromelysin-1またはtransinとも呼ばれ、フィブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカン、各種コラーゲンなどを分解する。MMP-7 (E.C.3.4.24.33) は、matrilysinまたはPUMPとも呼ばれ、タイプIVおよびタイプXコラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、ゼラチン、ラミニン、プロテオグリカンなどを分解する。MMP-8 (E.C.3.4.24.34) は、collagenase-2またはneutrophil collagenaseとも呼ばれ、タイプIコラーゲンをタイプIIやタイプIIIよりも優先的に分解する。MMP-13は、collagenase-3とも呼ばれ、タイプIIコラーゲンに対して特異性が高い。MT1-MMP (membrane type-1 matrix metalloproteinase) は、MMP-14とも呼ばれ、プロMMP-2およびプロMMP-13を活性化する。アグリカネースは、ADAM-TS (a disintegrin and metalloproteinase-thrombospondin) ファミリーに属し、軟骨アグリカンを分解する。

【0010】

これらの蛋白質分解酵素は、近年リコンビナント法によって製造され、供給されるようになった。本発明者は、これらの蛋白質分解酵素を椎間板ヘルニア注入療法に使用し、その有効性を確認して本発明を完成した。これらのヒト由来の蛋白質分解酵素は、植物性の酵素に比べてより安全性が高いと考えられる。

【発明の実施の形態】

【0011】

本発明は、1または複数のヒト由来の蛋白質分解酵素を有効成分とするヘルニアの治療剤である。有効成分とする蛋白質分解酵素は細胞外マトリックス分解酵素であり、例えば、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-13、MT1-MMP (MMP-14) およびアグリカネース (aggrecanase) である。

【0012】

本発明のヘルニア治療剤はヘルニア患部に直接投与される。例えば椎間板穿刺

でレントゲン透視下に経皮的に穿刺針を進め、椎間板内に穿刺する。そこから、脱出椎間板ヘルニア方向に内筒を進めて脱出したヘルニアに選択的に穿刺して、本発明の薬剤を注入する。または硬膜外腔注射により投与することができる。本発明のヘルニア治療剤をこのように投与することによってヘルニアの自然退縮を促進させることができる。

【0013】

本発明のヘルニア治療剤の使用に際しては、神経症状で神経根症や馬尾症、脊髄症などの神経症状を有し、磁気共鳴画像法（MRI）により神経圧迫の状態および椎間板ヘルニアの部位並びに程度を確認するという診断が必要である。また、椎間板造影検査により、治療を行う部位のヘルニア塊を造影して椎間板ヘルニアの部位並びに程度を正確に判断することが重要である。

【0014】

従って、本発明の一態様は、椎間板ヘルニアの疑いがある患者に対してMRIと椎間板造影検査を実施し、患者に椎間板ヘルニアが認められた場合には、その病態に応じて本発明のヒト由来の蛋白質分解酵素をヘルニア患部に直接投与して、ヘルニア組織の自然退縮を促進する椎間板ヘルニアの治療方法である。

【0015】

本発明のヘルニア治療剤の投与量は、ヘルニアの程度、患者の状態、蛋白質分解酵素の種類等により異なる。本発明のヘルニア治療剤は、患部に直接投与され、その投与量は通常1回当たり約1 μ g～100mgの範囲である。投与回数は、1回から数回が望ましいが、退縮の度合いを見てさらに多くすることができる。

【0016】

【実施例】

本発明を下記の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1 ヒト椎間板ヘルニア手術検体を用いた器官培養実験

手術時に摘出した腰椎椎間板ヘルニア検体（4℃にて保存）を、細かく切断し、湿重量を測定し、1検体を60～80 μ gとなるように配分して、96ウエル（well）プレート内に入れた。ついで以下の試料溶液を加え、37℃においてCO

2インキュベーター内で24時間培養した。

- (1) コントロール/DMEM培地 200 μ l
- (2) ヒトリコンビナントMMP-3 (45kDa) 20 μ g/200 μ l
- (3) ヒトリコンビナントMMP-7 (19kDa) 20 μ g/200 μ l
- (4) ヒトリコンビナントMMP-3 10 μ g+ ヒトリコンビナントMMP-7 10 μ g/200 μ l
- (5) ヒトリコンビナントMMP-3 20 μ g+ ヒトリコンビナントMMP-7 20 μ g/200 μ l
- (6) キモパpain 1、5、10、50、100、500 pkt(picoKatal)/200 μ l

ヒトリコンビナントMMP-3 (CHEMICON社) およびヒトリコンビナントMMP-7 (CHEMICON社) は4℃でDMEM培地に溶解した。キモパpainはポジティブコントロールであり、キモパpain (ICN Biomedicals) を1mMのEDTA, 0.067mMのメルカプトエタノール、5.5mMのシステイン塩酸塩を含む液に溶かし、25℃、pH6.2で30分インキュベートし活性化してDMEM培地に添加した。

得られた培養物の湿重量を測定し、統計学的計算をした。その結果を図1に示す。図1から明らかなように、MMP-3、MMP-7を使用する場合および両者を併用する場合は、コントロールに比して湿重量が有意に減少する。

ついで、検体を4%パラホルムアルデヒドに入れ、組織標本を作成し、これをサフラニンO染色した結果を図2に示す。その結果、MMP-3、MMP-7またはキモパpainを加えて器官培養したものは、コントロールと比較して優位に染色性の低下(ヘルニアの退縮)を示した。

【0017】

実施例2 ウサギ椎間板への注入実験

日本白色ウサギ(3~4kg)を以下の手順で処理し、薬剤の椎間板内注入による効果を検定した。

1. ケタミン塩酸塩0.5~1.0ml/kgを皮下注射することにより、前投薬処理をした。

2. 体を固定し、耳の静脈に23Gトンボ針でラインを取りテープで固定（ライン確保）した。ペントバルビタールナトリウムを生理食塩水で半分の濃度に薄め（0.5mg/ml）、0.5～1.0ml/kgをワンショットで注射し静脈麻酔した。その後は適宜1mlずつを注射する。バリカンで体毛を刈り、半側臥位に固定した（後側方アプローチ）。

3. ドレーピング、電気メス（エアトーム）セットを用い、皮を切り、皮下を展開して、椎体、肋骨から筋肉を剥離し椎間板を露出した。

4. 椎間板に直接的に次の薬剤を注入した。

（1）ヒトリコンビナントMMP-3 10 μ g/100 μ lおよび40 μ g/100 μ l（Microcon YM-3で濃縮したもの）

（2）ヒトリコンビナントMMP-7 10 μ g/100 μ lおよび40 μ g/100 μ l（Microcon YM-3で濃縮したもの）

（3）キモパイン 1kptおよび5kpt

（1mMのEDTA、0.067mMのメルカプトエタノール、5.5mMのシステイン塩酸塩を含む液に溶かして25℃、pH6.2で30分インキュベートして活性化して使用した）

（4）コントロール：生理食塩水（NS:normal saline）

薬剤は100 μ lを椎間板内に注入した。濃度の異なる薬剤を2個所の椎間板に、生理食塩水のみを1個所の椎間板に投与し、マーキング用ワイヤーを椎体に埋め込んだ。

5. ナイロン針で各層を閉じ、ウサギをケージ内でフリーにした。

6. 注射1週後、ケタミン塩酸塩3mlを注射し、ライン確保した後、耳静脈に23Gトンボ針を固定し、ペントバルビタールナトリウム（1mg/ml）3mlを投与（全量で5～7ml）した。

7. 椎体を一まとめにして(en bloc) 摘出し、4%ホルマリン溶液で固定して、組織標本を作成した。

8. 組織標本を脱パラフィンし、1%酢酸水溶液に溶かした0.03%ファーストグリーンで5分間染色した。ついで、1%酢酸水溶液で洗浄後、0.25%サフラニンOで7分間染色した。

その結果を図3に示す。コントロールと比較してMMP-3、MMP-7およびキモパイン注入群は有意に染色性が低下した。また、MMP-3注入群は椎間板狭小化が認められた。

【0018】

実施例3 イヌ椎間板ヘルニアへの注入実験

イヌ特にビーグル犬などは高率に椎間板ヘルニアに罹患し、重症の場合は両下肢麻痺等の症状を呈する。イヌのヘルニアの組織像は、ヒトのヘルニアの組織像と非常に類似している。ヘルニアに罹患し下肢麻痺を起こしたミニチュアダックスフンド7才、6.35kgの第1～第2腰椎椎間板ヘルニアを外科的に摘出した組織を標本とし、ヘマトキシリンエオジン染色し、顕微鏡写真に撮影した結果を図4として示す。この組織標本は、イヌのヘルニアがヒトのヘルニアモデルとして非常に適切であることを示している。

椎間板ヘルニアを自然発症したビーグル犬の椎間板ヘルニアに薬剤を注入してその効果を次のように検討した。ヒトリコンビナントMMP-7の試験には7才、体重12.75kgのビーグル犬を、ヒトリコンビナントMMP-3の試験には7才、体重14.4kgのビーグル犬を用いた。薬剤の注入前に椎間板のMRIを撮影して、正常な椎間板高位、変性している高位、ヘルニアを認める高位を確認した。

MMP-7の投与：ビーグル犬の第12胸椎（T12）と第13胸椎（T13）の間の椎間板に20 μ g/200 μ l、第13胸椎（T13）と第1腰椎（L1）の間の椎間板および第1腰椎（L1）と第2腰椎（L2）の間の椎間板に10 μ g/100 μ l注入した。コントロールとして、第2腰椎（L2）と第3腰椎（L3）の間の椎間板に生理食塩水を200 μ l注入した。

MMP-3の投与：ビーグル犬の第11胸椎（T11）と第12胸椎（T12）の間の椎間板に10 μ g/100 μ l、第12胸椎（T12）と第13胸椎（T13）の間の椎間板に20 μ g/200 μ l、第13胸椎（T13）と第1腰椎（L1）の間の椎間板に10 μ g/100 μ l注入した。第10胸椎（T10）と第11胸椎（T11）の間の椎間板にコントロールとして生理食塩水を200 μ l注入した。

薬剤の椎間板内への注入はレントゲン透視下に脊椎針(Spinal Needle)を用いて行った(図5)。シリンジはツベルクリン用(全量1ml)を用いた。注入後1週間後に再度MRIを測定した。注入前と注入後の椎間板のMRIを図6～8に示した。

【0019】

図6はMMP-7を用いた場合の結果を示すMRIのT1強調画像であり、図7はMMP-7を用いた場合の結果を示すMRIのT2強調画像である。T1強調画像はヘルニア実質を見るのに有効であり、T2強調画像は軟骨組織である椎間板の分解をみるのに有効である。注入前のT12とT13の間に観察されたヘルニアは、注入後の画像において明瞭な退縮をしている。図8は、MMP-3を用いた場合の結果を示す水分強調画像(T2)であり、薬剤投与によるヘルニアの退縮が観察される。

【0020】

ついで、MMP-7を投与したビーグル犬を屠殺し、注入した椎間板を含む脊椎ユニットを一まとめにして摘出し、4%パラホルムアルデヒド溶液で固定して脱灰操作を行ってから、組織標本を作成した(図9)。詳しくは、4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した後、10mM PBSで洗浄、エタノールおよびクロロホルムにて脱脂を行う。次いで、脱灰液(Plank Rychlo method: Wako, Japan)を用いて脱灰操作を行った。脱灰が十分なことを確認し、パラフィン包埋を行い、組織標本を作成した。

その組織標本を脱パラフィン後、1%酢酸水溶液に溶かした0.03%ファーストグリーンで5分間染色した。ついで、1%酢酸水溶液で洗浄後、0.25%サフラニンOで7分間染色した。

その切片の写真(マクロ図)を図10に示した。MMP-7注入後とあるのは、MMP-7を200 μ l注入した部位(第12胸椎と第13胸椎間)の切片であり、生食注入後とあるのは、生理食塩水を注入した第2腰椎と第3腰椎の間の切片である。その切片をさらに詳細に示したものが、図11および図12である。図11はMMP-7を注入したものであり、その左上隅には図10の下段と同じマクロ図が示されている。中段はマクロ図を2倍に拡大したものであり、下段

は2倍拡大図の一部をさらに10倍に拡大したものである。図12は、生理食塩水を注入したものであり、その左上隅がマクロ図、中段が2倍拡大図、下段がその10倍拡大図である。図10、図11および図12を比較すると、MMP-7を注入した場合には、生理食塩水の場合と比較して、染色性が著しく低下している。これはMMP-7の注入によって髓核内の構造が破綻したことを示している。これに対し、生理食塩水の場合の髓核構造の乱れは、注入個所のみであり、染色性は維持されている。このことから、軟骨基質の破壊は認められない。

【0021】

実施例4 イヌ椎間板ヘルニアを用いた分子生物学的検討

実施例3と同様に、椎間板ヘルニアを自然発症している、ビーグル犬(7才、体重14.0kg)の第2頸椎(C2)と第3頸椎(C3)の間の椎間板にMMP-7を20 μ g/200 μ l、第3頸椎(C3)と第4頸椎(C4)の間の椎間板に生理食塩水200 μ lを注入した。注入1週間後に椎間板からタンパク抽出を行い、ヒト成人軟骨のプロテオグリカン抗体を用いて、椎間板内軟骨の分解についてウエスタンブロッティングによる分子生物学的検討を行った。ヒト成人軟骨のプロテオグリカン抗体はイヌの交差が確認されており、コアタンパクとケラタン硫酸側鎖を認識することが確認されている。

ビーグル犬を屠殺したのち、できるだけ早く脊椎ユニットを摘出し氷中にて保存する。次に目的とする部位の椎間板組織を、他の組織が混入しないように注意してメスなどを用いて分離する。採取した組織を10cmディッシュに入れ、RIPA(Radio Immuno Precipitation Assay)緩衝液4mlにプロテイナーゼ阻害剤の錠剤(Roche: proteinase inhibitor cocktail tablets)1個を溶かした溶液を加えてディッシュ内で破碎する。RIPA緩衝液の組成は150mM NaCl、1%Triton-100、0.5%デオキシコール酸ナトリウムおよび0.1%SDSを含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)である。4℃にて、一晚攪拌した後、ディッシュ内の溶液を採取して、4℃、3000rpm、5分遠心する。その上清を、抽出タンパクとして実験に用いた。

ビーグル犬の椎間板からのタンパクの他、膝関節周囲の骨腫瘍の摘出手術の際に得られたヒトの正常膝軟骨から抽出したタンパクをポジティブコントロールと

して用いた。

各タンパクの抽出液をプロテインアッセーにて濃度を調整した上で、Laemmli Sample Bufferを加え、95℃、3分間ボイルし、12%ゲル（第一化学、PAGミニゲル）を用いて、SDS-PAGEを行った（80V、180分）。続いて、ニトロセルロース膜に転写した（0.1A、45分）。これにChemicon(Temecula, CA, USA)社製のヒト成人軟骨プロテオグリカン抗体を反応させ、ついでECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK) によって発色させた。その結果を図13に示した。図中Mは分子量マーカーであり、PCはヒトの正常な膝軟骨から抽出したタンパクを用いたポジティブコントロールであり、C2/3はMMP-7を注入した椎間板から抽出したタンパクであり、C3/4は生理食塩水を注入した椎間板から抽出したタンパクであり、C5/6は無処理の椎間板（第5頸椎と第6頸椎の間）から抽出したタンパクである。

40kDaから100kDaまでのバンドはG1ドメインを含むコアタンパクとケラタン硫酸側鎖を示している。バンドが単一でないのは、臨床検体であるために、生理的酵素などによるプロテオグリカンの分解度によっていくつかの分解産物が存在することを表している。ヒトの正常な膝軟骨から抽出したタンパクを用いたポジティブコントロール（PC）の場合は、様々なMMPやアグリカネースなどのプロテオグリカン分解酵素が存在するため、プロテオグリカンの分解産物が検出された。生理食塩水注入の場合（C3/4）および無処理の場合（C5/6）でも、プロテオグリカンの分解産物が検出された。これらと比較して、MMP-7注入の場合はプロテオグリカンの分解産物の量は明らかに減少している。これは、MMP-7が椎間板ヘルニア内のプロテオグリカン进行分解した結果である。

【0022】

手術で除去されたヘルニア検体を用いた器官培養実験（実施例1）により、MMP-3およびMMP-7がヘルニアを分解することが明らかとなった。また、ウサギ椎間板への注入実験（実施例2）、ビーグル犬の自然発症ヘルニアへの注入実験（実施例3）およびイヌ椎間板ヘルニアを用いた分子生物学的検討（実施例4）により、MMP-3およびMMP-7の椎間板内注入により椎間板および

椎間板ヘルニアのマトリックス分解が起きることが明らかとなった。これらの事実から、MMP-3 およびMMP-7 が椎間板ヘルニア治療に有効であることが確認された。

【0023】

【発明の効果】

MMP-3 およびMMP-7 のような、ヒト由来の蛋白質分解酵素を直接ヘルニア患部に投与する本発明のヘルニア治療剤によって、ヘルニアを速やかに治療することができる。ヒト由来の蛋白質分解酵素は、これまで臨床応用されたキモパパインのような植物由来の酵素と比べて、アナフィラキシーなどの重篤な免疫反応の発症を予防し、より高い安全性を持っている。

【図面の簡単な説明】

【図1】

椎間板ヘルニア検体をMMP-3、MMP-7、その混合物、ポジティブコントロールとしてのキモパパイン、およびコントロール（DMEM培地）と培養した場合の重量変化を示す図である。

【図2】

椎間板ヘルニア検体をMMP-3、MMP-7、その混合物、ポジティブコントロールとしてのキモパパインと培養して得られた組織標本を、サフラニンOで染色した結果を示す図である。

【図3】

ウサギの椎間板にMMP-3、MMP-7、ポジティブコントロールとしてのキモパパイン、およびコントロールとしての生理食塩水（NS）を注入し、1週間後に屠殺して作成した椎体標本をサフラニンOで染色した結果を示す図である。

【図4】

ヘルニアを自然発症したミニチュアダックスフンドから摘出した、ヘルニアの組織標本（ヘマトキシリンエオジン染色）の顕微鏡写真を示す図である。

【図5】

ヘルニアを自然発症しているビーグル犬の椎間板にX線透視下でMMP-7を

注入する図である。

【図 6】

ヘルニアを自然発症しているビーグル犬の椎間板にMMP-7を注入する前（Pre）と注入後（Post）のMRI（脂質強調画像T1）である。

【図 7】

ヘルニアを自然発症しているビーグル犬の椎間板にMMP-7を注入する前（Pre）と注入後（Post）のMRI（水分強調画像T2）である。

【図 8】

ヘルニアを自然発症しているビーグル犬の椎間板にMMP-3を注入する前（Pre）と注入後（Post）のMRI（水分強調画像T2）である。

【図 9】

ヘルニアを自然発症しているビーグル犬の椎間板にMMP-7およびコントロールとしての生理食塩水を注入し、1週間後に屠殺して作成した椎体標本をカットした状態を示す図である。

【図 10】

ヘルニアを自然発症しているビーグル犬の椎間板にMMP-7およびコントロールとしての生理食塩水を注入し、1週間後に屠殺して作成した椎体標本をサフラニンOで染色した結果を、MMP-7注入と生理食塩水注入について示す図である。

【図 11】


ヘルニアを自然発症しているビーグル犬の椎間板にMMP-7を注入し、1週間後に屠殺して作成した椎体標本をサフラニンOで染色した結果を示す図である。

【図 12】

ヘルニアを自然発症しているビーグル犬の椎間板にコントロールとしての生理食塩水を注入し、1週間後に屠殺して作成した椎体の組織標本をサフラニンOで染色した結果を示す図である。

【図 13】

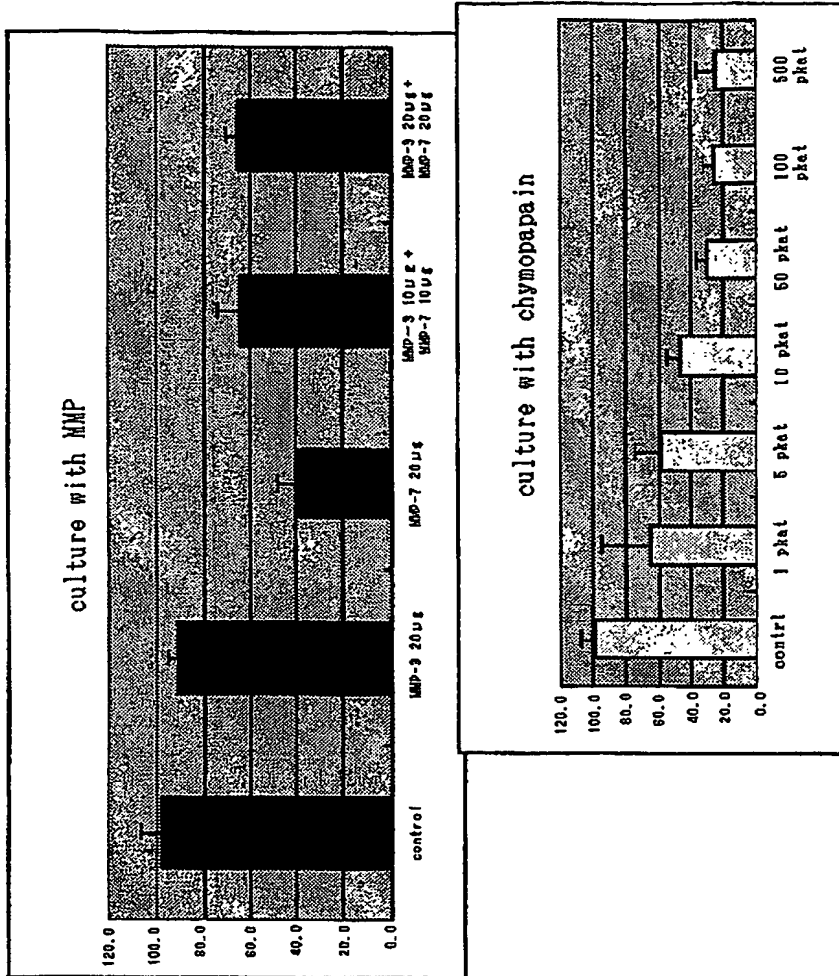
MMP-7によるプロテオグリカンの分解を試験したウエスタンブロット法の



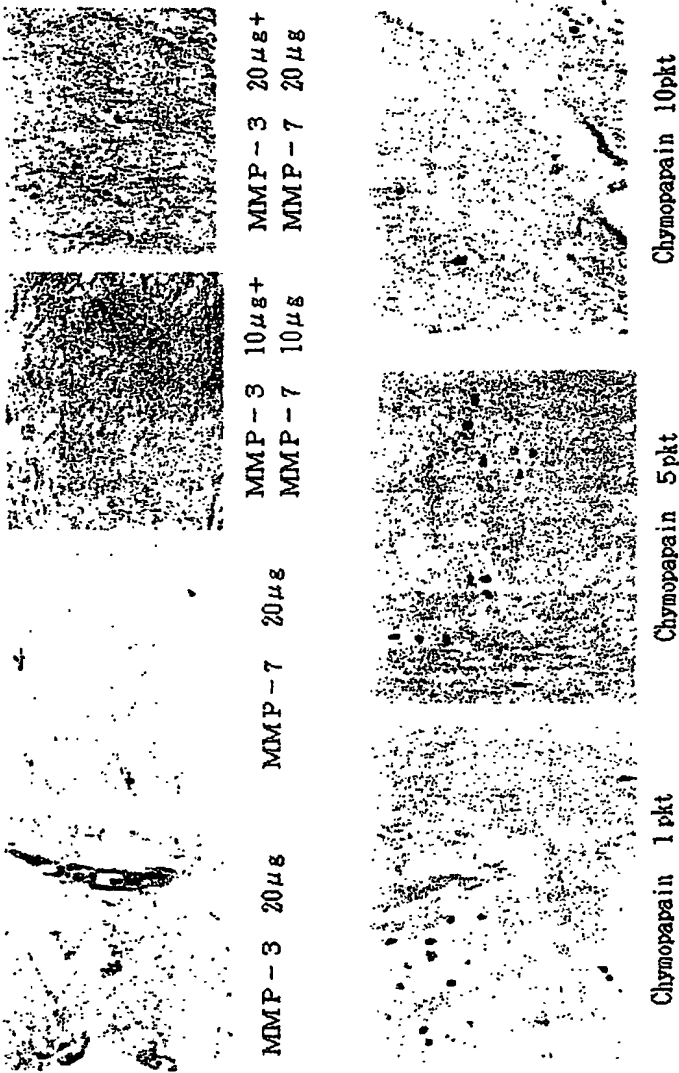
結果を示す図である。

【書類名】 図面

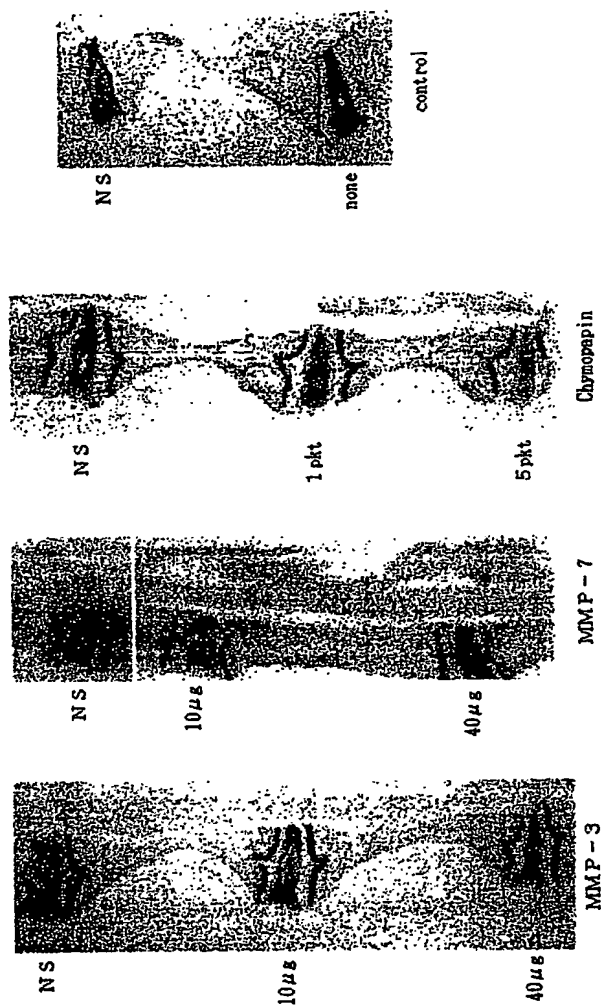
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【図4】

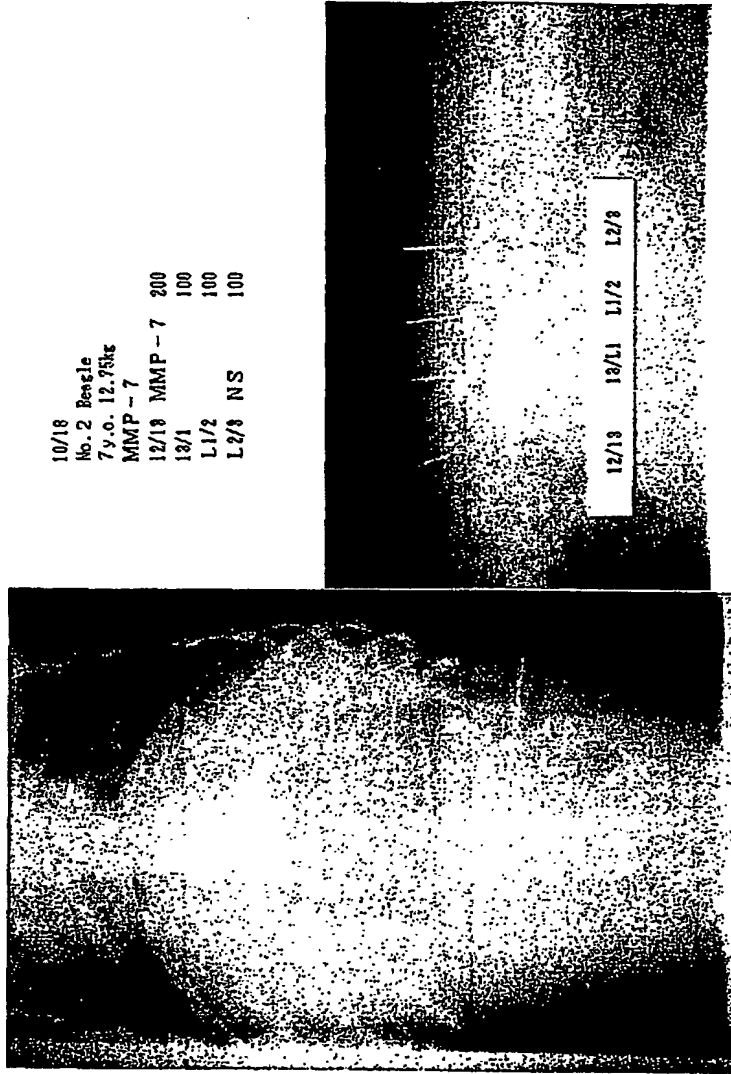
イヌヘルニア検体(HE)



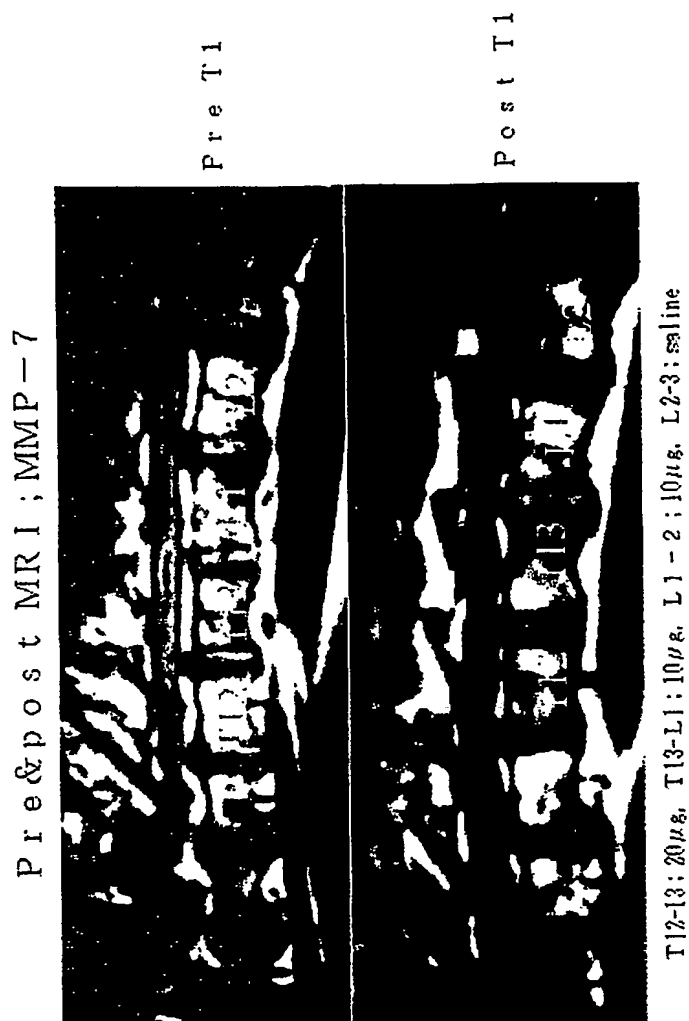
【図 5】

MMP-7 投与

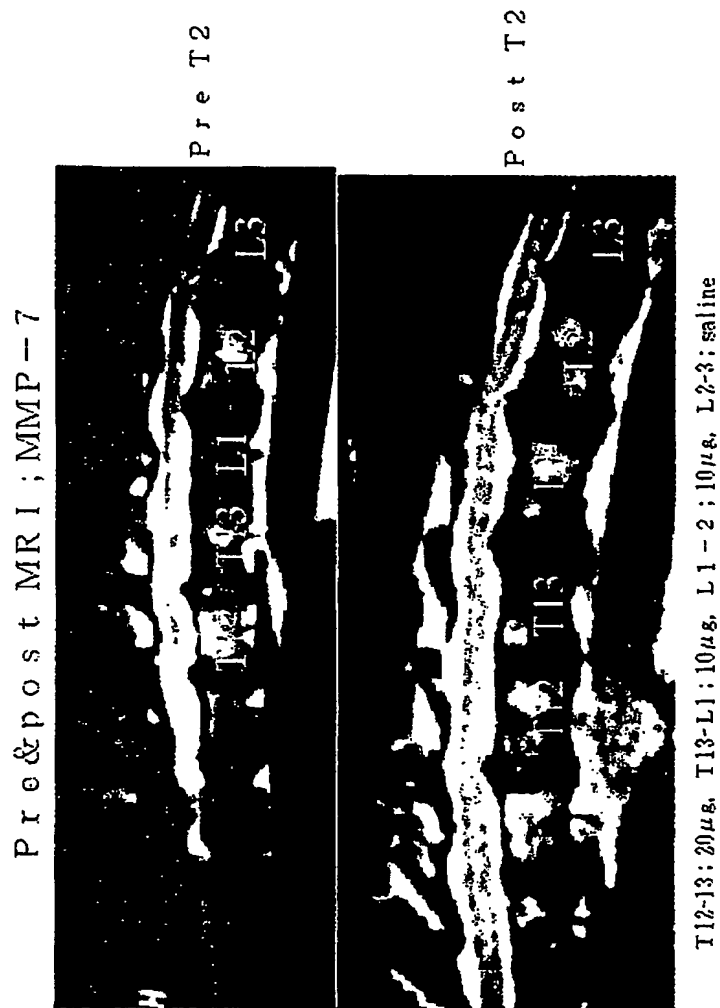
10/18	
No. 2 Beagle	
7y.o. 12.75kg	
MMP-7	
12/18 MMP-7	200
13/1	100
L1/2	100
L2/3 NS	100



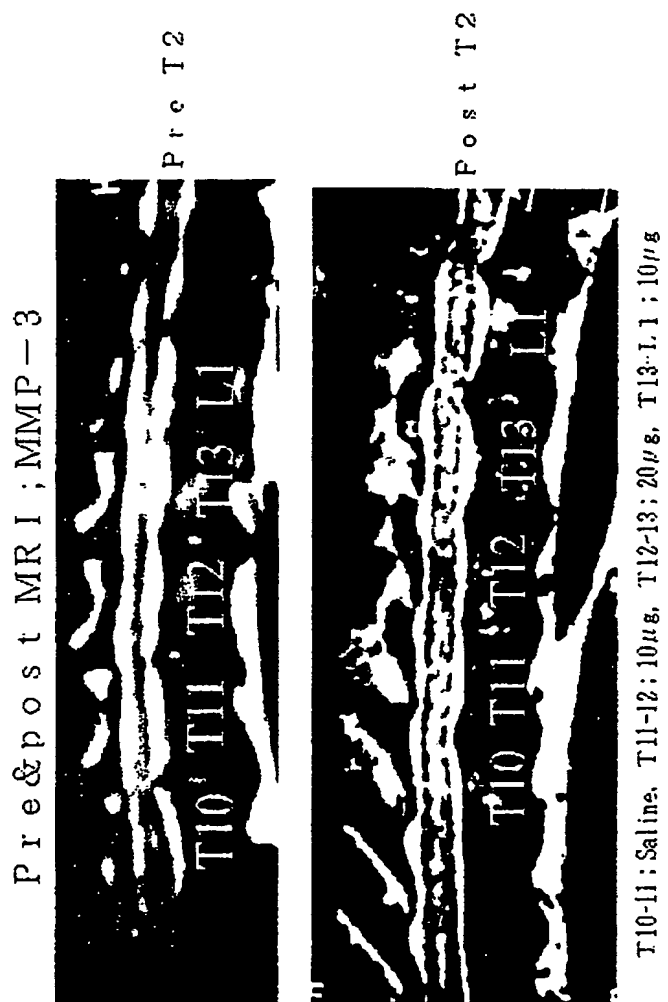
【図6】



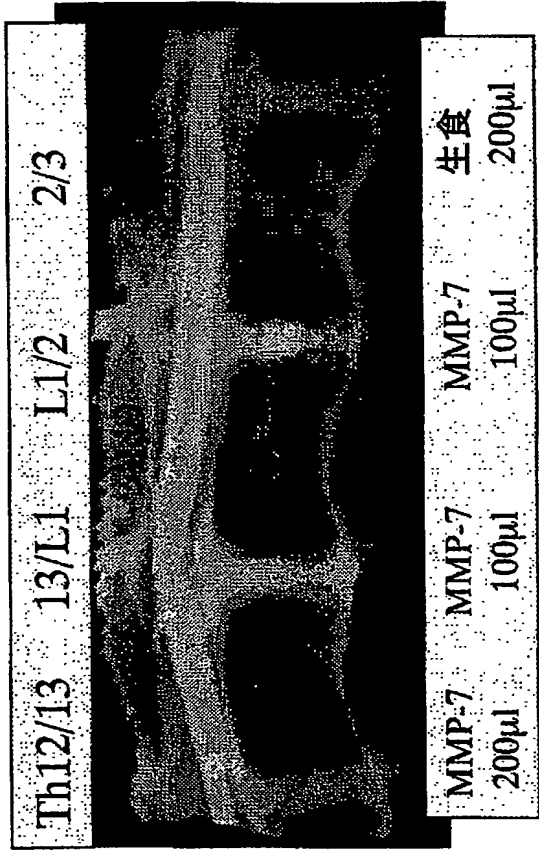
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【図 10】



生食 注入後



MMP-7 注入後

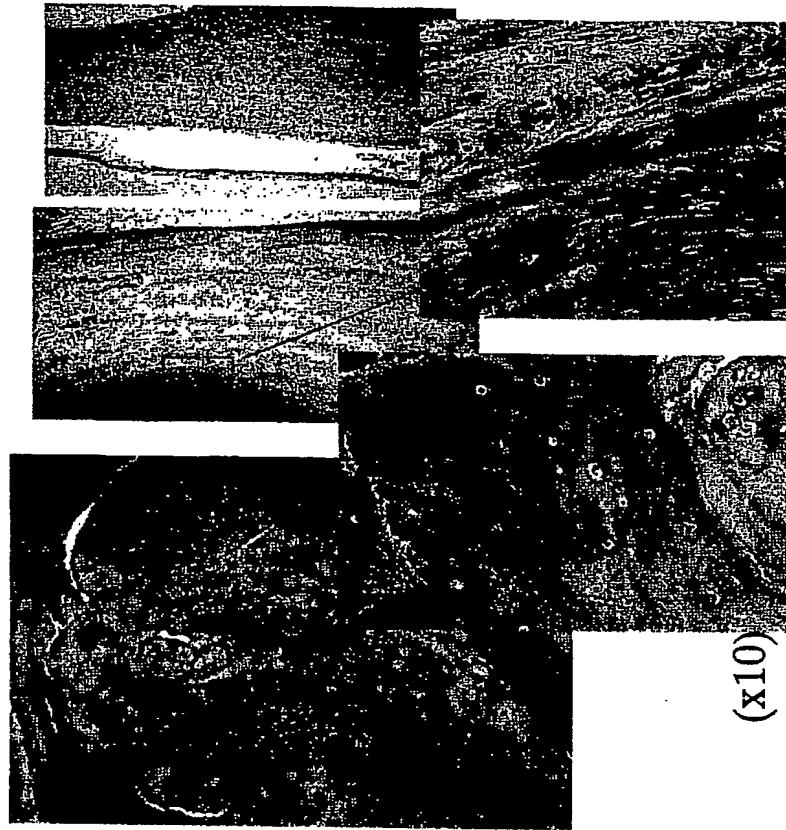
マクロ, サフラニンO 染色

【図11】

MMP-7注入後サフラニンO染色



(マクロ)

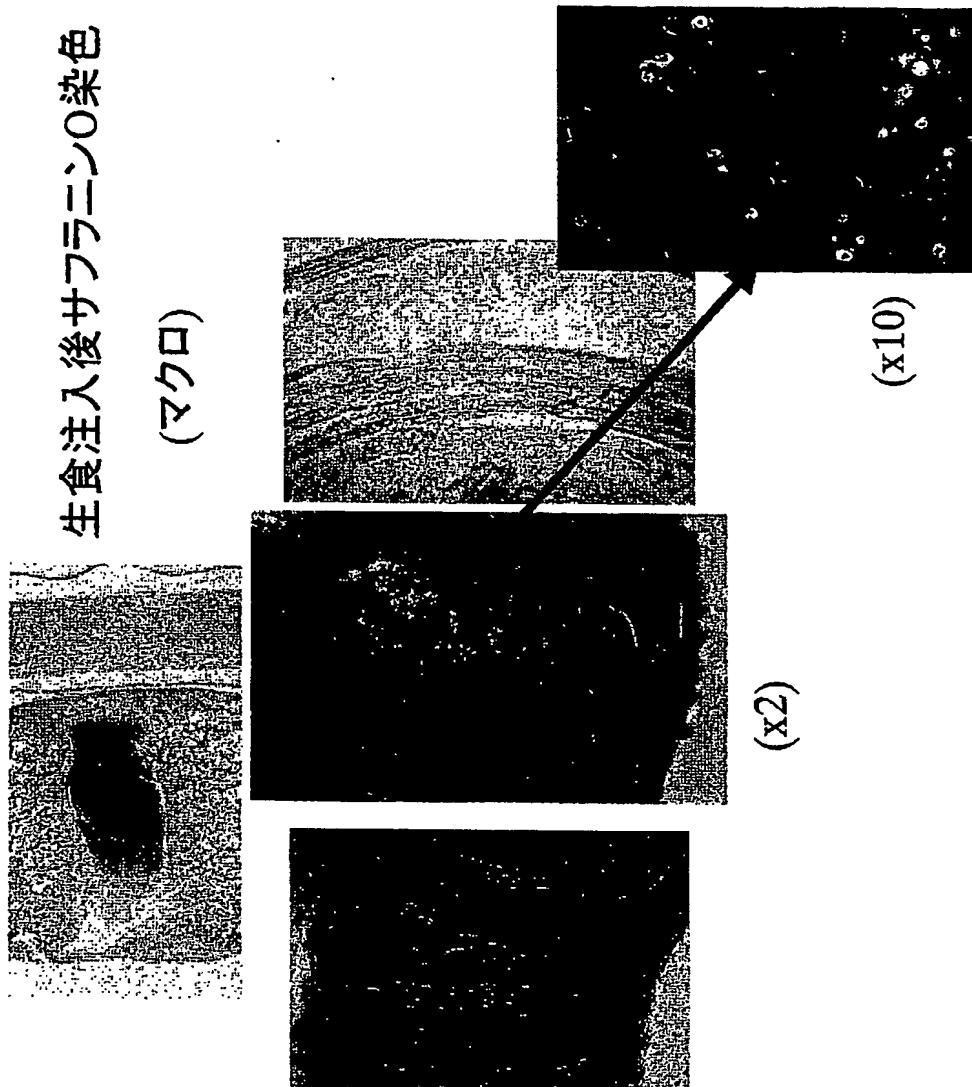


(x10)

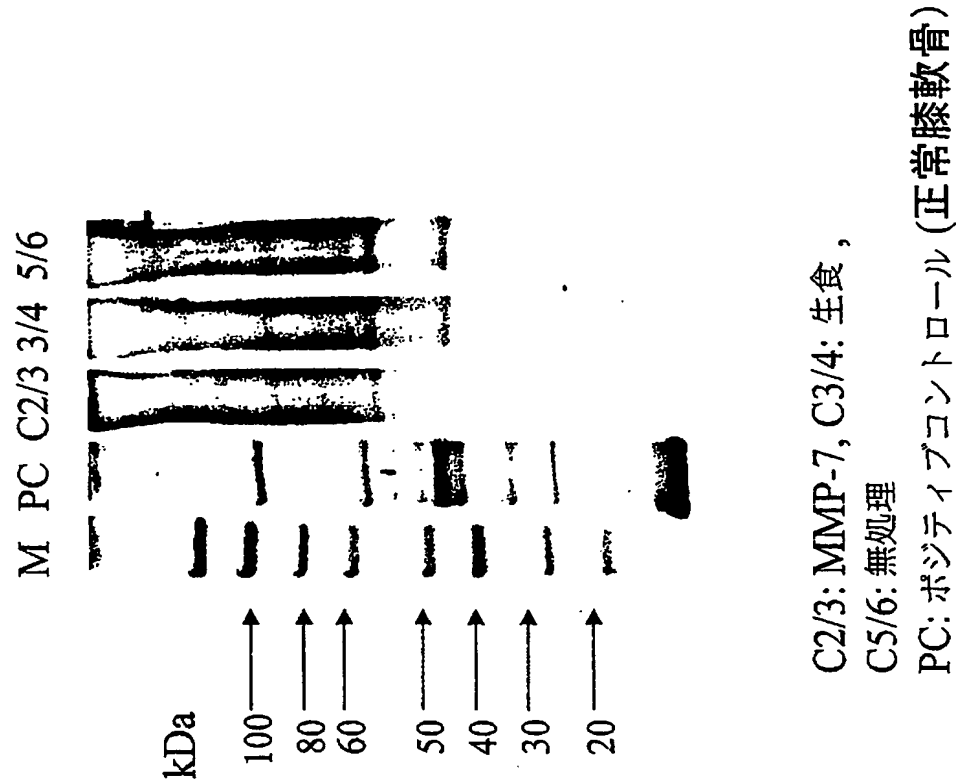


(x2)

【図 12】



【図 13】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 椎間板ヘルニアの治療剤を提供する。

【解決手段】 ヒト由来の蛋白質分解酵素を、椎間板ヘルニア患部に直接投与する薬剤として用いる。ヒト由来の蛋白質分解酵素としては、MMP-3、MMP-7等が使用できる。

【選択図】 なし

特願 2003-187675

出願人履歴情報

識別番号

[303035396]

1. 変更年月日

2003年 6月26日

[変更理由]

新規登録

住所

東京都小金井市貫井北町2-11-19

氏名

小森 博達

特願 2003-187675

出願人履歴情報

識別番号

[303035385]

1. 変更年月日

2003年 6月26日

[変更理由]

新規登録

住所

東京都目黒区南2-10-8

氏名

波呂 浩孝

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.